

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 193 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(21) Anmeldenummer: 99122651.5

(22) Anmeldetag: 13.11.1999

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/60, C12N 15/54,  
C12N 15/77, C12P 13/02  
// C12N1/21, C12R1:15,  
C12R1:19

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855314

(71) Anmelder:  
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft  
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:

- Rieping, Mechthild, Dr.  
33619 Bielefeld (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.  
33613 Bielefeld (DE)
- Pfefferle, Walter, Dr.  
33790 Halle (DE)
- Dusch, Nicole, Dr.  
33619 Bielefeld (DE)
- Kalinowski, Jörn, Dr.  
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof.Dr.  
33739 Bielefeld (DE)

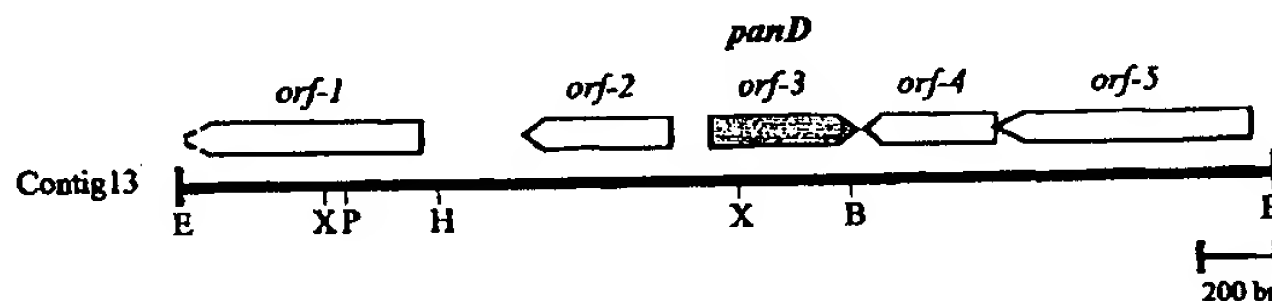
(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation von D-Pantothensäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Stämme einsetzt, die

a) das Plasmid pFV31 und/oder pFV202 enthalten, und man in diesen Mikroorganismen

- b) das panD-Gen und gegebenenfalls weitere für die Aspartat-1-decarboxylase codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,  
c) die Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert und  
d) die gebildete Pantothensäure isoliert.

Abbildung 1



# Beschreibung

## Stand der Technik

- 5 [0001] Die Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.
- [0002] Pantothersäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid
- 10 hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt und D-Pantolacton mit  $\beta$ -Alanin kondensiert und man erhält D-Pantothersäure.
- [0003] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten D-Form der Pantothersäure, die frei von L-Pantothersäure ist.
- [0004] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und  $\beta$ -Alanin enthält, D-Pantothersäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothersäure-Biosynthesegenen, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und  $\beta$ -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothersäure verbessert wird.
- 20 [0005] EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 betreffen von *Escherichia coli* Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069 die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure,  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure tragen und in einer Nährlösung, die Glucose enthält, Pantoinsäure, und in einer Nährlösung, die Glucose und  $\beta$ -Alanin enthält, D-Pantothersäure produzieren.
- 25 [0006] In EP-A 0 590 857 wird weiterhin gezeigt, daß nach Amplifikation von nicht genau spezifizierten Pantothersäure-Biosynthesegenen, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in einer Nährlösung, die Glucose enthält, die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und  $\beta$ -Alanin enthält, die Produktion von D-Pantothersäure verbessert wird.
- [0007] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß nach Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II durch Amplifikation der *ilvGM*-Gene mittels Plasmid pFV202, einem Enzym der Valin Biosynthese, in
- 30 einer Nährlösung, die Glucose enthält, die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und  $\beta$ -Alanin enthält, die Produktion von D-Pantothersäure verbessert wird.
- [0008] Den genannten Textstellen ist nicht zu entnehmen, inwieweit die genannten Stämme in einer Nährlösung, die lediglich Glucose oder lediglich Saccharose als Substrat enthalten, Pantothersäure produzieren.

## Aufgabe der Erfindung

- [0009] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt Pantothersäure-bildende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung *Escherichia* weiter zu verbessern.

## Beschreibung der Erfindung

- [0010] Das Vitamin Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse
- 45 daran, verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothersäure bereitzustellen.
- [0011] Wenn im Folgenden D-Pantothersäure oder Pantothersäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freie Säure sondern auch die Salze der D-Pantothersäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.
- [0012] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothersäure durch Fermentation von
- 50 D-Pantothersäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung *Escherichia*, das dadurch gekennzeichnet ist, daß diese
- a) das Plasmid pFV31 und/oder pFV202, bevorzugt pFV31 enthalten, und in denen man
- b) das *pand*-Gen und gegebenenfalls weitere für die Aspartat-1-decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
- 55
- [0013] Bevorzugt setzt man Mikroorganismen mit einer DNA ein, deren Nukleotidsequenz für *pand* mit der Herkunft aus *E. coli*, insbesondere coryneformen Bakterien codiert. Bevorzugt handelt es sich um eine replizierbare DNA,

die dadurch gekennzeichnet ist, daß

- (i) die Nucleotidsequenz, gezeigt in SEQ.-ID.-Nr. 1, für panD codiert, oder
- (ii) diese der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 5 (iii) diese mit einer zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert und gegebenenfalls
- (iiii) diese funktionsneutrale Sinnmutationen in (i) trägt.

[0014] Die Fermentation findet bevorzugt in einer Nährlösung statt, die ausschließlich Glucose oder Saccharose als Substrat enthält und frei von  $\beta$ -Alanin und Pantoinsäure ist.

10 [0015] Die Produktion der Pantothersäure wird so erfindungsgemäß verbessert. Der Zusatz von Aspartat,  $\beta$ -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure und/oder deren Salzen wird gegebenenfalls gewünscht.

[0016] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

15 [0017] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothersäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Bevorzugt werden Glucose oder Saccharose eingesetzt. Es handelt sich dabei insbesondere um Gram-negative Bakterien, wie z. B. die der Familie Enterobacteriaceae. Bei diesen ist besonders die Gattung Escherichia mit der Art Escherichia coli zu nennen. Innerhalb der Art Escherichia coli sind die sogenannten K-12 Stämme, wie z. B. die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhard et al.: Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) oder der Escherichia coli Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten geeignet, die die Fähigkeit besitzen Pantothersäure zu produzieren. Hierbei sind

25 besonders die Stämme 3547/pFV31, 5714/pFV31, 525/pFV31, 814/pFV31, 521/pFV31, FV221/pFV31, FV6051/pFV31, FV5069/pFV31, FV5069/pFV202 und solche, die durch konventionelle Mutagenese, Selektion, z. B. auf Antimetabolit-Resistenz, wie Azidothymidin-Resistenz, Thiaisoleucin-Resistenz und Screening aus diesen hervorgegangen sind, zu nennen. Speziell geeignet sind die Stämme FV5069/pFV31 und FV5069/pFV202, die als FERM BP 4395 und FERM BP 5227 gemäß Budapest Vertrag hinterlegt sind (siehe EP-A-0590857 und WO 97/10340).

30 [0018] Zur Erzielung einer Verstärkung, insbesondere einer Überexpression, erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene, oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression

35 verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

40 [0019] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134:1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13:347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40:183-190 (1985)), bei de Breer et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America 80:21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26:222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80:161-169 (1989)), bei Hamilton (Journal of Bacteriology 171:4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998) und in bekannten Lehrbüchern der

45 Genetik und Molekularbiologie.

[0020] Das panD-Gen von E. coli ist bekannt. Die Nukleotidsequenz wurde von Merkels und Nichols (FEMS Microbiology Letters 143, 247-252 (1996)) publiziert. Zur Isolierung bzw. Herstellung des panD-Gens von E. coli kann eine PCR- (Polymerase Kettenreaktion) Methode, wie sie allgemein bekannt ist, oder eine der unten aufgeführten Methoden angewendet werden.

50 [0021] Zur Isolierung des panD-Gens von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) die in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E.coli Stamm K-12 NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur

Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αMCR, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

[0022] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebracht. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV9 (Vallari und Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), die eine Mutation im *panD*-Gen trägt, von besonderem Interesse. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der *panD*-Mutante DV9 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen, wie z.B. das *panD*-Gen trägt und Expression desselben, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothersäure-Bedürftigkeit prototroph.

[0023] Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden.

[0024] Auf diese Weise wurde die neue, für das Gen *panD* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Enzyms abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *panD*-Genproduktes nämlich der L-Aspartat 1-Decarboxylase dargestellt.

[0025] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 hybridieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

[0026] Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0027] Das auf diese Weise isolierte und charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder gegebenenfalls in Kombination mit anderen in den geeigneten Stämmen von *Escherichia coli* zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuexprimieren besteht darin, diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *E. coli* kommen z.B. die Vektoren pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21), 6557-6561 (1983)) oder pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)) oder der *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* Pendelvektor pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) für die vorliegende Erfindung in Frage. Beispiele für derartige Stämme von *E. coli* sind FV5069/pFV31/pND-D1 und FV5069/pFV31 pND-D2, die die Plasmide pND-D1 und pND-D2 enthalten. Plasmid pND-D1 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender *E. coli*-*C. glutamicum* Pendelvektor, der das *panD*-Gen von *E. coli* trägt. Plasmid pND-D2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender *E. coli*-*C. glutamicum* Pendelvektor der das *panD*-Gen von *C. glutamicum* trägt.

[0028] Es ist dem Fachmann klar, daß chromosomale Mutationen, die Resistenzen gegen Metabolite und Antimetabolite bewirken oder die das Abfließen von Vorstufen der Pantothersäure verhindern, einzeln oder gemeinsam in vorteilhafter Weise mit den Massnahmen, die Gegenstand der Erfindung sind, kombiniert werden können.

[0029] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothersäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0030] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,



Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können, wenn es gewünscht wird, die Vorstufen der Pantothenensäure wie Aspartat,  $\beta$ -Alanin, Ketoisovalerat oder Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0031] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 37°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0032] Es ist dem Fachmann klar, daß Stämme, die eine hohe Aktivität des Enzyms L-Aspartat 1-Decarboxylase besitzen, auch für die Herstellung von  $\beta$ -Alanin aus L-Aspartat eingesetzt werden können. Hierzu setzt man die bekannten fermentativen Verfahren, enzymatischen Umwandlungsreaktionen oder Kombinationen beider ein.

[0033] Die Konzentration an gebildeter Pantothenensäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.

[0034] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

[0035] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pND-D2 als DSM12438

#### Beispiele

[0036] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1

#### Klonierung und Sequenzierung des panD-Gens von *C. glutamicum*

#### 1. Klonierung des panD-Gens

[0037] Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid, 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sau3A, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 7-9 kb wurden mit Hilfe des "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland; Cat. No. 740584) isoliert und in die dephosphorylierte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 (Norlander et al., 1982, Gene, 26:101-106), der von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen wurde, ligiert. Die Ligation wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C konnte die *C. glutamicum* Genbank durch Reisolierung der Plasmid-DNA nach der "Alkalischen-Lyse-Methode" von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523, 1997) aus den Transformanten gewonnen werden. Mit dieser Genbank wurden kompetente Zellen des *E. coli* Stamms DV9 (Vallari und Rock, 1985, Journal of Bacteriology, 164:136-142), welcher eine Mutation im panD-Gen trägt, elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluß an die Regenerationsphase (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) zweimal mit Medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) gewaschen. Die Zusammen-

setzung des Mediums E ist in Tabelle 1 dargestellt. Mit diesen Zellen wurden 50 ml Medium E + 100 µg/ml Ampicillin, die in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vorlagen, inokuliert und in einem Luftschüttler bei 250 U/min und 39°C inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Bakteriensuspension verdünnt und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) ausgestrichen, der mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert worden war.

Tabelle 1

Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g	
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	3,5 g	
Zitronensäure	2 g	
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g	
Glukose	4 g	separat sterilisieren
Thiamin	0,2 µg	sterilfiltrieren

**[0038]** Die Plasmid-DNA einer DV9-Transformante wurde isoliert, als pNIC-1.3 bezeichnet und mittels Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) und Vergleich mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Länge charakterisiert. Plasmid pNIC-1.3 enthält eine Insertion von 7 kbp Länge. Die Komplementationsfähigkeit von pNIC-1.3 wurde durch erneute Transformation der panD Mutante DV9 überprüft.

**[0039]** Die erhaltenen Transformanten waren wiederum fähig, in β-Alanin-freiem Medium E unter den oben angegebenen Bedingungen zu wachsen.

**[0040]** Die Subklonierung des 7 kb Inserts erfolgte durch Spaltung des Plasmids pNIC-1.3 mit den Restriktionsenzymen BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-03), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRI, Code no. 27-0884-03) und BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BglII, Code no. 27-0946-02) und anschließender Ligation in den entsprechend restriktionsverdauten Vektor pK18mob (Schäfer, 1994, Gene, 145:69-73). Der erhaltene Ligationsansatz wurde in die E. coli panD Mutante DV9 elektroporiert; die Selektion auf komplementierte Transformanten erfolgte wie oben beschrieben wobei die Agarplatten in diesem Fall 50 µg/ml Kanamycin enthielten. Die Plasmide von komplementierten Einzelklonen wurden isoliert und mittels Restriktionsanalysen charakterisiert. Ein EcoRI-Subklon, im Folgenden pNIC-10 genannt, mit einem ungefähr 3 kb großen DNA-Insert wurde für die folgende Sequenzanalyse ausgewählt.

## 2. Sequenzierung des panD-Gens

**[0041]** Für die doppelsträngige Sequenzierung des 3 kb Fragments von pNIC-10 wurde dieses mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und die Fragmente in die Plasmide pUC19 oder pK18mob subkloniert. Die zum Sequenzieren eingesetzte Plasmid-DNA wurden nach Herstellerangaben mit dem "QIAGEN Plasmid Mini kit" (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA) isoliert und die Bestimmung der Plasmidgrößen wurde mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

**[0042]** Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 74:5463-5467, 1977) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research, 18:1067, 1990). Es wurde der "Cy5-AutoRead Sequencing kit" von Pharmacia (Product No. 27-2690-02, Freiburg, Germany) angewandt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem "Long Ranger Gel Solution"-Polyacrylamidgel (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) mit dem "automatischen Laser-Fluoreszenz (A.L.F.) Express DNA Sequenziergerät" von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (Nucleic Acids Research, 14:217-231, 1986) Version 97-0 prozessiert. Sämtliche Einzelsequenzen der pNIC-10 Subklone wurden zu einem zusammenhängenden 3060 bp langen Contig assembliert, der als Contig13 bezeichnet wurde. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) des gesamten DNA-Fragments ergab die Identifizierung von fünf offenen Leserasten (ORFs). In Abbildung 1 ist eine Restriktionskarte von Contig13 sowie die Lage der als orf-1 bis orf-5 bezeichneten ORFs dargestellt. Homologieanalysen wurden mit den "BLAST search programs" (Gish and States, 1993, Nature of Genetics, 3:266-272; Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology, 215:403-410), welche über den Online-Service des NCBI-Servers der

"National Library of Medicine" (Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Die Analyse von Contig13 ergab, daß orf-3 das panD-Gen ist. Im Folgenden wird orf-3 als panD bezeichnet. Die Nukleotidsequenz des das panD-Gen tragenden DNA-Fragmentes ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Aminosäuresequenz des sich mit obigen Methoden ergebenden panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat 1-Decarboxylase ist als SEQ ID NO 2 wiedergegeben.

## Beispiel 2

### Konstruktion von Vektoren zur Expression von panD-Genen

- [0043] Die Pantothenatbiosynthese-Gene panD aus *C. glutamicum* und panD aus *E. coli* wurden unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonucleotiden amplifiziert. Die PCR-Experimente wurden mit der Taq DNA polymerase der Firma Gibco-BRL (Eggestein, Deutschland) in einem "PCT-100 Thermocycler" (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) durchgeführt. Auf einen einmaligen Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C folgte ein Denaturierungsschritt von 90 Sekunden bei 94°C, ein Annealingschritt für 90 Sekunden bei einer Primer-abhängigen Temperatur von  $T=(2AT+4GC) - 5^{\circ}\text{C}$  (Suggs, et al., 1981, S. 683-693, In: D. D. Brown, and C. F. Fox (Eds.), *Developmental biology using purified genes*. Academic Press, New York, USA) sowie ein 90 sec dauernder Extensionsschritt bei 72°C. Die letzten drei Schritte wurden 35 mal zyklisch wiederholt und die Reaktion wurde mit einem finalen Extensionsschritt von 10 Minuten bei 72°C beendet. Die so amplifizierten Produkte wurden, nachdem sie im Agarosegel elektrophoretisch geprüft worden sind, den Herstellerangaben entsprechend in den Vektor pCR®2.1 (Original TA Cloning Kit, Invitrogene (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01.) ligiert und anschließend in den *E. coli* Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion auf Transformanten erfolgte durch Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid).
- [0044] Ausgehend von den Nucleotidsequenzen des Pantothenatbiosynthese-Gens panD von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Abbildung 2) und von *E. coli* K12 (W.K. Merkel and B.P. Nichols, 1993, GenBank: L17086) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Diese Primer wurden so ausgewählt, daß die amplifizierten Fragmente die Gene sowie deren native Ribosomen-Bindestellen, nicht aber mögliche Promotor-Regionen enthalten. Zusätzlich wurden geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt, die das Klonieren in den Zielvektor ermöglichen. Die Sequenzen der PCR-Primer, die eingefügten Schnittstellen (Sequenz unterstrichen) sowie das amplifizierte Gen (Fragmentgröße in bp ist in Klammern angegeben) sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2

Primer	Sequenz mit Restriktionsschnittstelle	Produkt	Plasmid
panD-Ec1	5' - <u>GAATTC</u> GACAGGGTAGAAAGGTAGA - 3' EcoRI	panD <sub>E.c.</sub>	pND-D1
panD-Ec2	5' - <u>AGATCT</u> GGGATAACAATCAAGCAACC - 3' BglII		
panD-Cg1	5' - CATCTCACGCTAT <u>GAATTCT</u> - 3' EcoRI	panD <sub>C.g.</sub>	pND-D2
panD-Cg2	5' - ACGAGGCCTGCAGCAATA - 3' PstI		

[0045] Als Basisvektor zur Expression sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde der in Abbildung 2 dargestellte *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Expressionsvektor pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) eingesetzt. Das zuvor in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 klonierten *panD*<sub>C.g.</sub> Amplifikat wurden mittels der Primerinserierten Restriktionsschnittstellen in den ebenso behandelten Expressionsvektor pZ8-1 ligiert und somit unter die Kontrolle des auf diesem Plasmid enthaltenen *tac*-Promotors gebracht. Das Amplifikat *panD*<sub>E.c.</sub> wurde als *EcoRI*-*BglII*-Fragment in die kompatiblen *EcoRI*-*BamHI*-Restriktionssenden des Vektors pZ8-1 kloniert. Die jeweiligen Plasmidbezeichnungen für die so konstruierten Expressionsplasmide sind in der Tabelle 2 angegeben. Die Klonierungsstrategie für die Gene *panD*<sub>E.c.</sub> und *panD*<sub>C.g.</sub> ist in der Abbildung 2 dargestellt. Die korrekte Klonierung der Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Inserts überprüft.

[0046] Diese Plasmide pND-D1 und pND-D2 wurden in den *E. coli* Stamm FV5069/pFV31 transformiert und Transformanten auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 50 µg/ml Kanamycin selektioniert. Die erhaltenen Stämme wurden FV5069/pFV31/pND-D1 und FV5069/pFV31/pND-D2 genannt.

### Beispiel 3

#### Bildung von Pantothenat durch verschiedene von *E. coli* FV5069/pFV31 abgeleitete Stämme

[0047] Die quantitative Bestimmung von D-Pantothenat erfolgte mittels des *Lactobacillus plantarum* Pantothenat-Assays (Teststamm: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, Cat. No.3211-30-3; Kulturmedium: Bacto Pantothenate Assay Medium (DIFCO Laboratories, Michigan, USA), Cat. No. 0604-15-3) Dieser Indikatorstamm kann nur bei Anwesenheit von Pantothenat im angegebenen Kulturmedium wachsen und zeigt eine photometrisch meßbare, lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenat-Konzentration des Mediums. Für die Kalibrierung wurde das Hemicalciumsalz von Pantothenat eingesetzt (Sigma, Produktbezeichnung P 2250). Die optische Dichte wurde an einem LKB Biochrom Photometer der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 580 nm (o.D.<sub>580</sub>) bestimmt.

[0048] Die Pantothenat-Produktion der *E. coli* Stämme FV5069/pFV31, FV5069/pFV31/pND-D1 und FV5069/pFV31/pND-D2 mit Glucose oder Saccharose als Substrat wurde bestimmt. Als Testmedium wurde Medium E verwendet, das entweder 4 g/l Glucose oder 4 g/l Saccharose als Substrat enthielt und im Falle der Stämme FV5069/pFV31/pND-D1 und FV5069/pFV31/pND-D2 mit 50 µg/ml Kanamycin supplementiert wurde. 50 ml Testmedium, die in einem 500 ml Erlenmeyerkolben vorlagen, wurden ausgehend von einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums so angeimpft, daß die o.D.<sub>580</sub> von 0,1 betrug. Nach 72 Stunden Inkubation dieser Kulturen bei 37°C und 250 U/min wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 x g pelletiert. Der erhaltene zellfreie Überstand wurde sterilfiltriert und bis zur Pantothenat-Quantifizierung bei 4 °C gelagert.

[0049] Die Quantifizierung des D-Pantothenats im Kulturüberstand erfolgte mittels *L. plantarum* ATCC 8014 nach Angaben des Handbuchs der Firma DIFCO (DIFCO MANUAL, 10<sup>th</sup> Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3

Pantothenat-Akkumulation mit Glucose als Substrat		
Stamm	Gen	Pantothenat (µg/ml)
FV5069/pFV31	-	2
FV5069/pFV31/pND-D1	<i>panD</i> <sub>E.c.</sub>	24
FV5069/pFV31/pND-D2	<i>panD</i> <sub>C.g.</sub>	58

Tabelle 4

Pantothenat-Akkumulation mit Saccharose als Substrat		
Stamm	Gen	Pantothenat (µg/ml)
FV5069/pFV31	-	2



Tabelle 4 (fortgesetzt)

Pantothenat-Akkumulation mit Saccharose als Substrat		
Stamm	Gen	Pantothenat (µg/ml)
FV5069/pFV31/pND-D1	panD <sub>E.c.</sub>	47
FV5069/pFV31/pND-D2	panD <sub>C.g.</sub>	69

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenensäure unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version

#1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 540 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 77..484
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon\_start= 77  
/EC\_number= 4.1.1.11  
/product= "L-Aspartat-1-Decarboxylase"  
/gene= "panD"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AATATTCCTT TCCTTGTCAT CTCACGCTAT GATTTCCTAAA ACTTGCAGGA CAACCCCAT 60  
 AAGGACACCA CAGGAC ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC 109  
 Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His  
 1 5 10  
 CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC 157  
 Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr  
 15 20 25  
 ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GCC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA 205  
 Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys  
 30 35 40  
 GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC 253  
 Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val  
 45 50 55  
 ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT 301  
 Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala  
 60 65 70 75  
 GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT 349  
 Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu  
 80 85 90  
 CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC 397  
 Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His  
 95 100 105  
 GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA 445  
 Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu  
 110 115 120  
 GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTAA 494  
 Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile  
 125 130 135  
 GCTCGCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC 540  
 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LAENGE: 136 Aminosaeuren  
 (B) ART: Aminosaeure  
 (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:  
 Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu  
 20 25 30  
 Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp  
 35 40 45  
 Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala

50 55 60

5 Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala Ala His Leu Ile Asn  
65 70 75 80

Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala  
85 90 95

10 Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn  
100 105 110

Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser  
115 120 125

15 Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile  
130 135

20

# Abbildungen

25 [0050] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

Abbildung 1: Karte des Contig13 mit orf1-orf5

Abbildung 2: Karte des Plasmids pZ8-1 und Klonierungsstrategie der Plasmide pND-D1 und pND-D2

30 [0051] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

T1T2: Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens

35 Ptac: tac Promotor

panD: Kodierbereich des panD Gens

rep-C.g.: DNA-Region für Replikation in C. glutamicum

40 oriV-E.c.: Ursprung für vegetativen Transfer in E. coli

kan: Resistenzgen für Kanamycin

45 EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI

E: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI

BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI

50 B Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI

BglII: Schnittstelle des Restriktionsenzym BglII

55 ClaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym ClaI

H: Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII



P: Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI

PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI

5 Sall: Schnittstelle des Restriktionsenzym Sall

Scal: Schnittstelle des Restriktionsenzym Scal

SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI

10 X: Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI

XhoI: Schnittstelle des Restriktionsenzym XhoI

# 15 **Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation von D-Pantothensäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß man Stämme einsetzt, die

- a) das Plasmid pFV31 und/oder pFV202 enthalten, und man in diesen Mikroorganismen  
b) ein panD-Gen und gegebenenfalls weitere für die Aspartat-1-decarboxylase codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert.  
25 c) die Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert und  
d) die gebildete Pantothensäure isoliert.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
30 daß man Mikroorganismen mit einer replizierbaren DNA einsetzt, deren Nucleotidsequenz für panD mit der Herkunft aus einem Corynebacterium codiert.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
35 daß die replizierbare DNA charakterisiert wird durch

- (i) die Nucleotidsequenz, gezeigt in SEQ.-ID.-Nr. 1, die für panD codiert, oder  
(ii) eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht; oder  
40 (iii) eine Sequenz, die mit einer zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert und gegebenenfalls  
(iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i) trägt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
45 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zur Erzielung der Verstärkung (Überexpression) der Gene bzw. Nucleotidsequenzen die Kopienzahl mit Hilfe diese Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragender Plasmidvektoren erhöht.

- 50 5. Verfahren gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zur Erzielung der Überexpression die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.

- 55 6. Verfahren gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zur Erzielung der Überexpression stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man zur Erzielung der Verstärkung die Lebensdauer der mRNA, die von den oben genannten Sequenzen als  
Matrize abgelesen wird, verlängert und/oder den Abbau der(des) entsprechenden Enzymproteins(e) verhindert.
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, die zusätzliche Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen einzeln  
oder gemeinsam aufweisen.
9. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Mikroorganismen zur Erzielung der Überexpression in entsprechend geänderten Kulturmedien fer-  
mentiert oder die Fermentationsführung ändert.
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege, zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die  
die Pantothenat-(Pantothensäure) -bildung verringern.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zum panD-Gen die übrigen Gene des Stoffwechsel-  
weges der Pantothensäurebildung, insbesondere mit der Herkunft Corynebacterium, einzeln oder gemeinsam  
überexprimiert.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man eines oder mehrere der Gene, die für Enzyme Ketopantoat-  
Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12) und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren, zusätzlich zum panD-  
Gen, insbesondere mit der Herkunft Corynebacterium, überexprimiert.
13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 und 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man mit verschiedenen kompatiblen, die genannten Gene einzeln enthaltenden Plasmidvektoren transfor-  
mierte Mikroorganismen einsetzt.
14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 und 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Mikroorganismus der Art E.coli einsetzt, und der Plasmid-  
vektor eines oder mehrere der genannten Gene einschließlich des panD-Gens trägt, in dem die genannten Gene  
nacheinander angeordnet sind und unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promotors oder getrennt voneinander  
angeordnet unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt werden.
15. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen einsetzt, die den Plasmidvektor pND-D2 enthalten, der charakterisiert ist durch die in  
der Abb. 2 wiedergegebenen Restriktionskarte, hinterlegt als Corynebacterium glutamicum ATCC 13032/pND-D2  
unter der Bezeichnung DSM 12438.
16. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man folgende Schritte durchführt:
  - a) Fermentation von Mikroorganismen der Art E.coli, in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexpri-  
miert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem panB- und/oder panC-Gen,
  - b) Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
  - c) Isolieren der Pantothensäure.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die überexprimierten Gene aus Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* stammen.

5 18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 16 oder 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man in Stufe a) eine Vorstufe der Pantothersäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat,  $\beta$ -Alanin,  
Ketopantoat, Ketoisovalerat oder Pantoat.

10 19. Mikroorganismen der Gattung *E.coli*, die das Plasmid pFV 31 und/oder pFV 202 enthalten und transformiert sind  
durch die Einführung einer replizierbaren DNA,  
charakterisiert durch,

- 15 i) die Nucleotidsequenz, gezeigt in SEQ.-ID.-Nr. 1, die für panD codiert, oder
- (ii) eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes ent-  
spricht; oder
- (iii) eine Sequenz, die mit einer zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebe-  
nenfalls
- (iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

20

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

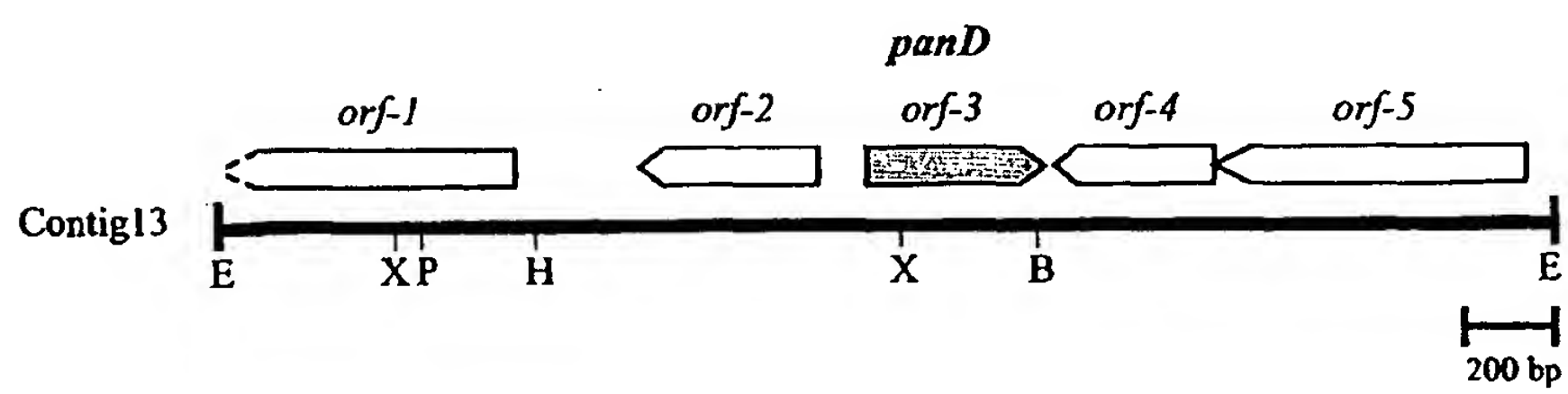
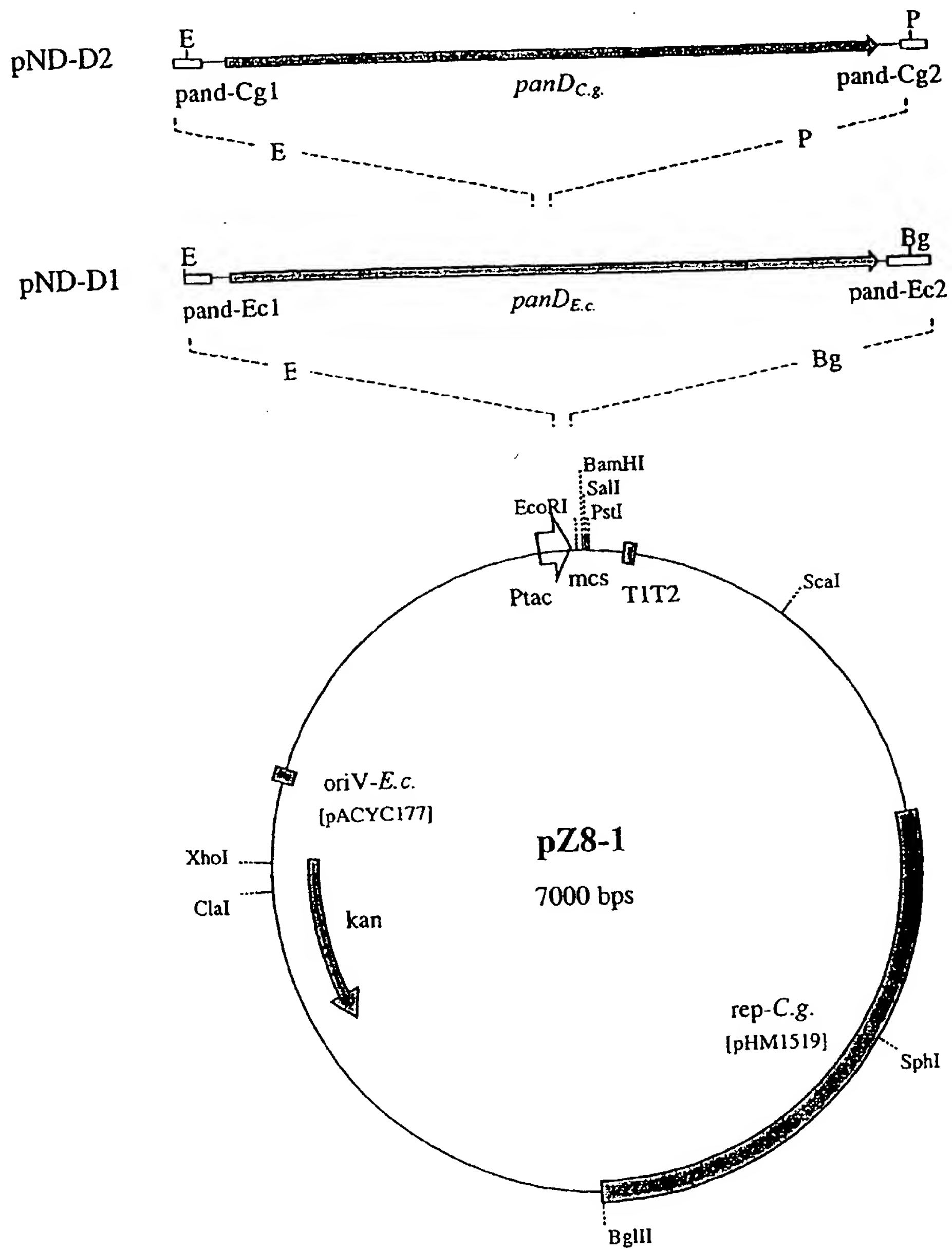
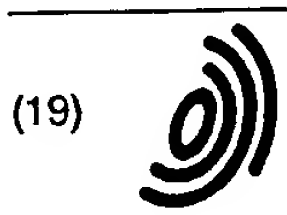




Abbildung 2







(19)

Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 193 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(21) Anmeldenummer: 99122651.5

(22) Anmeldetag: 13.11.1999

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/60, C12N 15/54,  
C12N 15/77, C12P 13/02  
// C12N1/21, C12R1:15,  
C12R1:19

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855314

(71) Anmelder:  
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft  
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:  
• Rieping, Mechthild, Dr.  
33619 Bielefeld (DE)  
• Thierbach, Georg, Dr.  
33613 Bielefeld (DE)  
• Pfefferle, Walter, Dr.  
33790 Halle (DE)  
• Dusch, Nicole, Dr.  
33619 Bielefeld (DE)  
• Kalinowski, Jörn, Dr.  
33615 Bielefeld (DE)  
• Pühler, Alfred, Prof.Dr.  
33739 Bielefeld (DE)

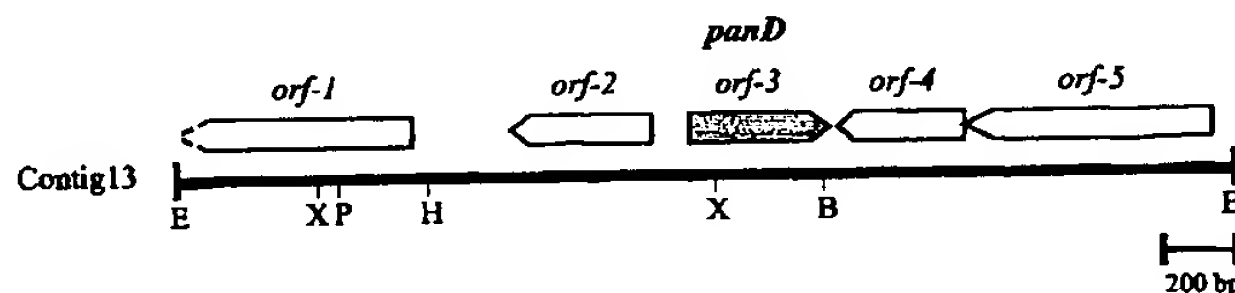
### (54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation von D-Pantothensäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Stämme einsetzt, die

a) das Plasmid pFV31 und/oder pFV202 enthalten, und man in diesen Mikroorganismen

b) das panD-Gen und gegebenenfalls weitere für die Aspartat-1-decarboxylase codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,  
c) die Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert und  
d) die gebildete Pantothensäure isoliert.

Abbildung 1



EP 1 006 193 A2

Process for the production of D-pantothenic acid by fermentation using strains of the Enterobacteriaceae family

The invention relates to a process for the production of D-pantothenic acid by fermentation of microorganisms which produce D-pantothenic acid and are of the Enterobacteriaceae family, which comprises employing strains which

- a) contain the plasmid pFV31 and/or pFV202,  
and, in these microorganisms,
- b) amplifying, in particular overexpressing, the panD gene and, where appropriate, other nucleotide sequences coding for aspartate 1-decarboxylase,
- c) concentrating the pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms and
- d) isolating the pantothenic acid formed.



## Description

### Prior art

Pantothenic acid is a commercially important vitamin which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition.

5 Pantothenic acid can be produced by chemical synthesis or biotechnologically by fermentation of suitable microorganisms in suitable nutrient solutions. An important intermediate of the chemical synthesis is DL-pantolactone. It is prepared in a multistage process from formaldehyde, isobutyraldehyde and cyanide. In further process steps, the racemic mixture is fractionated and D-  
10 pantolactone is condensed with  $\beta$ -alanine to result in D-pantothenic acid.

The advantage of production by fermentation of microorganisms is that the desired D form of pantothenic acid is formed directly and is free of L-pantothenic acid.

Various species of bacteria such as, for example, *Escherichia coli*,  
15 *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* and also yeasts such as, for example, *Debaromyces castellii* are able, as shown in EP-A 0 493 060, to produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose, DL-pantoic acid and  $\beta$ -alanine. EP-A 0 493 060 also shows that in the case of *Escherichia coli* the formation of D-pantothenic acid in a  
20 nutrient solution containing glucose, DL-pantoic acid and  $\beta$ -alanine is improved by amplification of pantothenic acid biosynthesis genes present on the plasmids pFV3 and pFV5.

EP-A 0 590 857 and US patent 5,518,906 relate to mutants derived from *Escherichia coli* strain IFO3547, such as FV5714, FV525, FV814, FV521,  
25 FV221, FV6051 and FV5069, which harbor resistances to various antimetabolites such as salicylic acid,  $\alpha$ -ketobutyric acid,  $\beta$ -hydroxyaspartic acid, O-methylthreonine and  $\alpha$ -ketoisovaleric acid and produce pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and  $\beta$ -alanine.

30 EP-A 0 590 857 also shows that after amplification of not exactly specified pantothenic acid biosynthesis genes present on the plasmid pFV31 in the abovementioned strains there is an improvement in the production of D-pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and in the production of D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and  $\beta$ -alanine.

35 WO 97/10340 additionally shows that after increasing the activity of the enzyme acetohydroxy acid synthase II by amplification of the *ilvGM* genes by means of plasmid pFV202, an enzyme of valine biosynthesis, there is an improvement in the production of D-pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and in the

production of D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and  $\beta$ -alanine.

5 It is not evident from said passages in the texts how far said strains produce pantothenic acid in a nutrient solution containing only glucose or only sucrose as substrate.

#### Object of the invention

10 The inventors' object is the further improvement of pantothenic acid-forming strains of the Enterobacteriaceae family, especially of the genus Escherichia.

#### Description of the invention

15 The vitamin pantothenic acid is a commercially important product which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition. There is thus a general interest in providing improved processes for the production of pantothenic acid.

Mention of D-pantothenic acid or pantothenic acid or pantothenate hereinafter means not only the free acid but also the salts of D-pantothenic acid such as, for example, the calcium, sodium, ammonium or potassium salt.

20 The invention relates to a process for the production of D-pantothenic acid by fermentation of microorganisms which produce D-pantothenic acid and are of the Enterobacteriaceae family, in particular of the genus Escherichia, where these  
a) contain the plasmid pFV31 and/or pFV202, preferably pFV31, and in which  
b) the panD gene and, where appropriate, other nucleotide sequences coding  
25 for aspartate 1-decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) are amplified, preferably overexpressed.

The microorganisms preferably employed have a DNA whose nucleotide sequence codes for panD originating from E. coli, in particular coryneform bacteria. It is preferably a replicable DNA wherein

- 30 (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No. 1 codes for panD, or  
(ii) the latter corresponds to the sequence (i) within the range of degeneracy of the genetic code, or  
(iii) the latter hybridizes with a sequence complementary to sequence (i) or (ii), and, where appropriate,  
35 (iiii) the latter harbors functionally neutral sense mutations in (i).

The fermentation preferably takes place in a nutrient solution which contains exclusively glucose or sucrose as substrate and is free of  $\beta$ -alanine or pantoic acid.

The production of pantothenic acid is improved in this way according to the invention. The addition of aspartate,  $\beta$ -alanine, ketoisovalerate, ketopantoic acid or pantoic acid and/or salts thereof is desired where appropriate.

5 The term "amplification" describes in this connection the increase in the intracellular activity of one or more enzymes in a microorganism which are encoded by the appropriate DNA, by, for example, increasing the copy number of the gene or genes, using a strong promoter or using a gene which codes for a corresponding enzyme with a high activity and, where appropriate, combining these measures.

10 The microorganisms to which the present invention relates are able to produce pantothenic acid from glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch, cellulose or from glycerol and ethanol. Glucose or sucrose is preferably employed. They are, in particular, gram-negative bacteria such as, for example, those of the Enterobacteriaceae family. Of these, particular mention  
15 should be made of the genus *Escherichia* with the species *Escherichia coli*. Suitable within the species *Escherichia coli* are the so-called K-12 strains such as, for example, the strains MG1655 or W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) or the *Escherichia coli* wild-type strain IFO3547 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan)  
20 and mutants derived therefrom having the ability to produce pantothenic acid. Mention should be made in this connection in particular of the strains 3547/pFV31, 5714/pFV31, 525/pFV31, 814/pFV31, 521/pFV31, FV221/pFV31, FV6051/pFV31, FV5069/pFV31, FV5069/pFV202 and those derived from the latter by conventional mutagenesis, selection, for example for antimetabolite resistance, such as  
25 azidothymidine resistance, thiaioleucine resistance and screening. Those specifically suitable are the strains FV5069/pFV31 and FV5069/pFV202, which are deposited as FERM BP 4395 and FERM BP 5227 in accordance with the Budapest Treaty (see EP-A 0 590 857 and WO 97/10340).

An amplification, in particular an overexpression, is achieved by  
30 increasing, for example, the copy number of the appropriate genes or mutating the promoter and regulatory region which is located upstream of the structural gene. Expression cassettes incorporated upstream of the structural gene act in the same way. It is additionally possible to increase the expression during the formation of D-pantothenate in a fermentation by inducible promoters. Expression is likewise  
35 improved by measures to extend the life span of the m-RNA. The enzymic activity is likewise enhanced by preventing the breakdown of the enzyme protein. The genes or gene constructs may either be present in plasmids with varying copy number or integrated and amplified in the chromosome. A further possible alternative is to

achieve overexpression of the relevant genes by changing the medium composition and management of the culture.

Instructions concerning this are to be found by the skilled worker inter alia in Chang and Cohen (Journal of Bacteriology 134:1141-1156 (1978)), in Hartley and Gregori (Gene 13:347-353 (1981)), in Amann and Brosius (Gene 40:183-190 (1985)), in de Breer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80:21-25 (1983)), in LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, in Llosa et al. (Plasmid 26:222-224 (1991)), in Quandt and Klipp (Gene 80:161-169 (1989)), in Hamilton (Journal of Bacteriology 171:4617-4622 (1989)), in Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) and in known text books of genetics and molecular biology.

The panD gene of *E. coli* is well known. The nucleotide sequence has been published by Merkels and Nichols (FEMS Microbiology Letters 143, 247-252 (1996)). The panD gene of *E. coli* can be isolated or produced by use of a PCR (polymerase chain reaction) method, as is generally known, or one of the methods listed below.

The panD gene of *C. glutamicum* is isolated by firstly setting up a gene bank of this microorganism in *E. coli*. The setting up of gene banks is set forth in generally known text books and handbooks. Mention may be made, as example, of the text book of Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) or the handbook by Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A well-known gene bank is that of the *E. coli* K-12 strain W3110, which was set up by Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$  vectors. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) describe a gene bank of *C. glutamicum* ATCC13032, which was set up in the *E. coli* strain K-12 NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) with the aid of the cosmid vector SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164). A gene bank of *C. glutamicum* in *E. coli* can also be produced by using plasmids such as pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) or pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268). Particularly suitable hosts are those *E. coli* strains which are restriction and recombination deficient. One example thereof is the strain DH5 $\alpha$ MCR, which was described by Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649).

The gene bank is subsequently introduced into an indicator strain by transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) or electroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347). The indicator strain is distinguished by having in the gene of interest a mutation



which gives rise to a detectable phenotype, for example an auxotrophy. The *E. coli* mutant DV9 (Vallari und Rock, Journal of Bacteriology, 1985, 164:136-142), which harbors a mutation in the *panD* gene is of particular interest for the purpose of the present invention. After transformation of the indicator strain, such as, for example, of the *panD* mutant DV9, with a recombinant plasmid which harbors the gene of interest, such as, for example, the *panD* gene, and expression thereof, the indicator strain becomes prototrophic with regard to the corresponding property, such as, for example, of pantothenic acid requirement.

The gene or DNA fragment isolated in this way can be characterized by determining the sequence as described, for example, by Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977).

The novel *C. glutamicum* DNA sequence coding for the *panD* gene was obtained in this way and is, as SEQ ID No. 1, a constituent of the present invention. In addition, the amino acid sequence of the corresponding enzyme has been derived from the available DNA sequence using the methods described above. The resulting amino acid sequence of the *panD* gene product, namely of L-aspartate 1-decarboxylase, is depicted in SEQ ID No. 2.

Coding DNA sequences resulting from SEQ ID No. 1 through the degeneracy of the genetic code are likewise a constituent of the invention. In the same way, DNA sequences which hybridize with SEQ ID No. 1 are a constituent of the invention. In addition, conservative amino acid exchanges such as, for example, exchange of glycine for alanine or of aspartic acid for glutamic acid in proteins are known to skilled workers as "sense mutations" which lead to no fundamental change in the activity of the protein, i.e. are functionally neutral. It is further known that modifications at the N and/or C terminus of a protein may negligibly impair or even stabilize its function.

Details on this are to be found by the skilled worker inter alia in Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), in O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), in Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), in Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) and in well-known text books of genetics and molecular biology.

The gene isolated and characterized in this way can then be expressed singly or, where appropriate, in combination with other ones in the suitable strains of *Eschericia coli*. A well-known method for expressing or overexpressing genes consists in amplifying them with the aid of plasmid vectors which, in addition, may be provided with expression signals. Suitable plasmid vectors are those able to replicate in the appropriate microorganisms. Suitable for the present invention for *E. coli* are, for example, the vectors pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the

National Academy of Sciences USA 80 (21), 6557-6561 (1983)) or pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)) or the *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vector pZ8-1 (European Patent 0 375 889). Examples of such strains of *E. coli* are

5 FV5069/pFV31/pND-D1 and FV5069/pFV31/pND-D2, which contain the plasmids pND-D1 and pND-D2. Plasmid pND-D1 is an *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle vector which is based on the plasmid pZ8-1 and which harbors the *panD* gene of *E. coli*. Plasmid pND-D2 is an *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle vector which is based on the plasmid pZ8-1 and harbors the *panD* gene of *C. glutamicum*.

10 It is clear to the skilled worker that chromosomal mutations which bring about resistances to metabolites and antimetabolites or which prevent the outflow of precursors of pantothenic acid can be combined singly or together in an advantageous manner with the measures to which the invention relates.

The microorganisms produced according to the invention can be

15 cultivated continuously or batchwise in a batch process or in a fed batch or repeated fed batch process in order to produce pantothenic acid. A summary of known cultivation methods is to be found in the text book by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) or in the text book by Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg

20 Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

The culture medium to be used must meet the requirements of the particular microorganisms in a suitable manner. Descriptions of culture media for various microorganisms are present in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C.,

25 USA, 1981). It is possible to use as source of carbon sugars and carbohydrates such as, for example, glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch and cellulose, oils and fats such as, for example, soybean oil, sunflower oil, peanut oil and coconut fat, fatty acids such as, for example, palmitic acid, stearic acid and linoleic acid, alcohols such as, for example, glycerol and ethanol and organic acids

30 such as, for example, acetic acid. These substances can be used singly or as mixture. It is possible to use as source of nitrogen organic nitrogen-containing compounds such as peptones, yeast extract, meat extract, malt extract, corn steep liquor, soybean flour and urea or inorganic compounds such as ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium carbonate and ammonium

35 nitrate. The sources of nitrogen may be used singly or as mixture. It is possible to use as source of phosphorus potassium dihydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate or the corresponding sodium-containing salts. The culture medium must additionally contain salts of metals such as, for example, magnesium sulfate or iron sulfate, which are necessary for growth. Finally, it is possible to

employ essential growth substances such as amino acids and vitamins in addition to the abovementioned substances. It is possible, if required, for precursors of pantothenic acid such as aspartate,  $\beta$ -alanine, ketoisovalerate or ketopantoic acid or pantoic acid and, where appropriate, salts thereof to be added to the culture medium. Said starting materials can be added to the culture in the form of a single batch or be fed in during the cultivation in a suitable manner.

The pH of the culture is controlled by employing basic compounds such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or acidic compounds such as phosphoric acid or sulfuric acid in a suitable manner. Foaming can be controlled by employing antifoams such as, for example, fatty acid polyglycol esters. To maintain the stability of plasmids it is possible to add to the medium suitable substances having a selective effect, for example antibiotics. Aerobic conditions are maintained by introducing oxygen or oxygen-containing gas mixtures such as, for example, air into the culture. The temperature of the culture is normally 25°C to 45°C and preferably 30°C to 37°C. The culture is continued until pantothenic acid formation is at a maximum. This aim is normally achieved within 10 hours to 160 hours.

It is clear to the skilled worker that strains which have a high activity of the enzyme L-aspartate 1-decarboxylase can also be employed for producing  $\beta$ -alanine from L-aspartate. This is done by employing the known fermentation processes, enzymatic transformation reactions or combinations of the two.

The concentration of pantothenic acid formed can be determined by known methods (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)).

The following microorganisms have been deposited at the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) in accordance with the Budapest Treaty:

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-D2 as DSM12438

#### Examples

The present invention is explained in detail below by means of examples.

## Example 1

### Cloning and sequencing of the panD gene of *C. glutamicum*

#### 5 1. Cloning of the panD gene

Chromosomal DNA from *C. glutamicum* ATCC 13032 was isolated as described by Tauch et al. (1995, Plasmid, 33:168-179) and partially cleaved with the restriction enzyme Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description Sau3A, Code no. 27-0913-02). DNA fragments in a size range of 7-9 kb were isolated using the "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey and Nagel, Düren, Germany; Cat. No. 740584) and ligated into the dephosphorylated BamHI cleavage site of the vector pUC19 (Norranders et al., 1982, Gene, 26:101-106), which was purchased from MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania). The ligation was carried out as described by Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) incubating the DNA mixture with T4 ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) overnight. This ligation mixture was then electroporated (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) into the *E. coli* strain DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 87:4645-4649) and plated out on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100  $\mu$ g/ml ampicillin. After incubating at 37°C for 24 hours it was possible to obtain the *C. glutamicum* gene bank by reisolating the plasmid DNA by the alkaline lysis method of Birnboim and Doly (Nucleic Acids Research, 7:1513-1523, 1979) from the transformants. This gene bank was used for electroporation of competent cells of the *E. coli* strain DV9 (Vallari and Rock, 1985, Journal of Bacteriology, 164:136-142) which harbors a mutation in the panD gene. The electroporation mixture was washed twice with medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) following the regeneration phase (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347). The composition of medium E is shown in Table 1. These cells were used to inoculate 50 ml of medium E + 100  $\mu$ g/ml ampicillin, which were present in a 250 ml Erlenmeyer flask, and they were incubated in an air shaker at 250 rpm and 39°C. After incubation for two days, the bacterial suspension was diluted and streaked onto LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) supplemented with 100  $\mu$ g/ml ampicillin.

Table 1

Substance	Amount per liter	Note
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g	
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.5 g	
Citric acid	2 g	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g	
Glucose	4 g	sterilize separately
Thiamine	0.2 µg	sterilize by filtration

The plasmid DNA of a DV9 transformant was isolated, called pNIC-1.3 and characterized by agarose gel electrophoresis (Sambrook et al., Molecular cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) and comparison with standard DNA fragments of known length. Plasmid pNIC-1.3 contains a 7 kbp-long insert. The complementation ability of pNIC-1.3 was checked by renewed transformation of the panD mutant DV9.

The resulting transformants were again able to grow in β-alanine-free medium E under the conditions indicated above.

Subcloning of the 7 kb insert took place by cleaving the plasmid pNIC-1.3 with the restriction enzymes BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description BamHI, Code no. 27-0868-03), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description EcoRI, Code no. 27-0884-03) and BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description BglII, Code no. 27-0946-02) and subsequently ligating into a vector pK18mob (Schäfer, 1994, Gene 145:69-73) which had been restriction-digested correspondingly. The resulting ligation mixture was electroporated into the E. coli panD mutant DV9; selection for complemented transformants took place as described above, the agar plates containing 50 µg/ml kanamycin in this case. The plasmids of complemented single clones were isolated and characterized by restriction analyses. An EcoRI subclone, called pNIC-10 hereinafter, with a DNA insert approximately 3 kb in size was selected for the following sequence analysis.

## 2. Sequencing of the panD gene

For the double-stranded sequencing of the 3 kb fragment of pNIC-10, the latter was cleaved with various restriction enzymes, and the fragments were subcloned into the plasmid pUC19 or pK18mob. The plasmid DNA employed for the sequencing was isolated in accordance with the manufacturer's instructions using



the "QIAGEN Plasmid Mini kit" (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA), and the plasmid sizes were determined by agarose gel electrophoresis.

The sequencing took place by the dideoxy chain termination method of Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 74:5463-5467, 1977) with the modifications of Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research, 18:1067, 1990). The "Cy5-AutoRead Sequencing kit" of Pharmacia (Product No. 27-2690-02, Freiburg, Germany) was used. The gel electrophoretic fractionation and analysis of the sequencing reaction took place in a "Long Ranger Gel Solution" polyacrylamide gel (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) with the automatic laser fluorescence (A.L.F.) express DNA sequencing apparatus from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The resulting crude sequence data were subsequently processed using the Staden program package (Nucleic Acids Research, 14:217-231, 1986) version 97-0. All the individual sequences of the pNIC-10 subclones were assembled to a coherent 3060 bp-long contig which was called contig 13. Computer-assisted coding region analysis using the XNIP program (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) of the complete DNA fragment resulted in identification of five open reading frames (ORFs). A restriction map of contig 13 and the location of the ORFs referred to as orf-1 to orf-5 is shown in Figure 1. Homology analyses were carried out with the "BLAST search programs" (Gish and States, 1993, Nature of Genetics 3:266-272; Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology, 215:403-410) which was made available through the online service of the NCBI server of the "National Library of Medicine" (Bethesda, MD, USA). Analysis of contig 13 revealed that orf-3 is the panD gene. Hereinafter, orf-3 is referred to as panD. The nucleotide sequence of the DNA fragment harboring the panD gene is depicted as SEQ ID NO 1. The amino acid sequence of the panD gene product resulting from the above methods, namely L-aspartate 1-decarboxylase, is depicted as SEQ ID NO 2.

## Example 2

30

### Construction of vectors for expression of panD genes

The pantothenate biosynthesis panD genes from *C. glutamicum* and *E. coli* were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) and synthetic oligonucleotides. The PCR experiments were carried out using the Taq DNA polymerase supplied by Gibco-BRL (Eggenstein, Germany) in a PCT-100 thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA). A single denaturation step of 2 minutes at 94°C was followed by a denaturation step of 90 seconds at 94°C, an annealing step for 90 seconds at a primer-dependent temperature of

T=(2AT+4GC) -5°C (Suggs, et al., 1981, p. 683-693, in: D. D. Brown, and C. F. Fox (Eds), Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York, USA) and an extension step lasting 90 seconds at 72°C. The last three steps were repeated cyclically 35 times, and the reaction was completed by a final extension step lasting 10 minutes at 72°C. The products amplified in this way were, after they had been checked by electrophoresis in an agarose gel, ligated into the vector pCR®2.1 (Original TA cloning kit, Invitrogen (Leek, the Netherlands), product description Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01) following the manufacturer's information, and then transformed into the E. coli strain TOP 10F'. Transformants were selected by incubation at 37°C for 24 hours on LB agar plates with 100 µg/ml ampicillin and 40 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside).

Starting from the nucleotide sequences of the pantothenate biosynthesis gene panD of C. glutamicum ATCC 13032 (Figure 2) and of E. coli K12 (W.K. Merkel and B.P. Nichols, 1993, GenBank: L17086), PCR primers were synthesized (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). These primers were selected so that the amplified fragments contained the genes and their natural ribosome binding sites but not possible promoter regions. In addition, suitable restriction cleavage sites were inserted to make cloning into the target vector possible. The sequences of the PCR primers, the inserted cleavage sites (sequence underlined) and the amplified gene (fragment size in bp is stated in parentheses) are listed in Table 2 below.

Table 2

Primer	Sequence with restriction cleavage site	Product	Plasmid
panD-Ec1	5'-GAATTCGACAGGGTAGAAAGGTAGA-3' EcoRI	panD <sub>E.c.</sub>	pND-D1
panD-Ec2	5'-AGATCTGGGATAACAATCAAGCAACC-3' BglII		
panD-Cg1	5'-CATCTCACGCTATGAATTCT-3' EcoRI	panD <sub>C.g.</sub>	pND-D2
panD-Cg2	5'-ACGAGGCCTGCAGCAATA-3' PstI		

The basic vector employed for expression both in C. glutamicum and in E. coli was the E. coli-C.glutamicum shuttle expression vector pZ8-1 (European Patent 0 375 889) depicted in Figure 2. The amplicon which had previously been cloned into the vector pCR®2.1 was ligated, by means of the primer-inserted



restriction cleavage sites, into the expression vector pZ8-1 which had been treated in the same way, and were thus brought under the control of the tac promoter present on this plasmid. The amplicon panD<sub>E.c.</sub>, as EcoRI-BglII fragment, was cloned into the compatible EcoRI-BamHI restriction ends of the vector pZ8-1. The respective  
5 plasmid names for the expression plasmids constructed in this way are indicated in Table 2. The strategy for cloning the panD<sub>E.c.</sub> and panD<sub>C.g.</sub> genes is depicted in Figure 2. Correct cloning of the expression plasmids was checked by sequencing the respective inserts.

These plasmids pND-D1 and pND-D2 were transformed into the E. coli  
10 strain FV5069/pFV31, and transformants were selected on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 50 µg/ml kanamycin. The resulting strains were called FV5069/pFV31/pND-D1 and FV5069/pFV31/pND-D2.

### Example 3

15

Formation of pantothenate by various strains derived from E. coli FV5069/pFV31

Quantitative determination of D-pantothenate took place using the Lactobacillus plantarum pantothenate assay (test strain: Lactobacillus plantarum  
20 ATCC 8014, Cat. No. 3211-30-3; culture medium: Bacto Pantothenate Assay Medium (DIFCO Laboratories, Michigan, USA), Cat. No. 0604-15-3. This indicator strain can grow only in the presence of pantothenate in the stated culture medium, and the growth shows a linear dependence, which can be measured by photometry, on the pantothenate concentration in the medium. The hemicalcium salt of  
25 pantothenate was employed for the calibration (Sigma, product number P 2250). The optical density was determined in an LKB Biochrom Photometer from Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany) at a measurement wavelength of 580 nm (O.D.<sub>580</sub>).

The pantothenate production of the E. coli strains FV5069/pFV31,  
30 FV5069/pFV31/pND-D1 and FV5069/pFV31/pND-D2 with glucose or sucrose as substrate was determined. The test medium used was medium E containing either 4 g/l glucose or 4 g/l sucrose as substrate and, in the case of the strains FV5069/pFV31/pND-D1 and FV5069/pFV31/pND-D2, supplemented with 50 µg/ml kanamycin. 50 ml of test medium in a 500 ml Erlenmeyer flask were inoculated from  
35 a 16 hour-old culture in the same medium so that the O.D.<sub>580</sub> was 0.1. After incubating these cultures at 37°C and 250 rpm for 72 hours, the cells were pelleted by centrifugation at 5000 × g for 10 minutes. The resulting cell-free supernatant was sterilized by filtration and stored at 4°C until quantification of pantothenate.

The quantification of the D-pantothenate in the culture supernatant took place using *L. plantarum* ATCC 8014 as stated in the DIFCO handbook (DIFCO MANUAL, 10th Edition, pp. 1100-1102; Michigan, USA). The results of these measurements are shown in Table 3 and Table 4.

5

Table 3

Pantothenate accumulation with glucose as substrate		
Strain	Gene	Pantothenate (µg/ml)
FV5069/pFV31	-	2
FV5069/pFV31/pND-D1	panD <sub>E.c.</sub>	24
FV5069/pFV31/pND-D2	panD <sub>C.g.</sub>	58

Table 4

10

Pantothenate accumulation with sucrose as substrate		
Strain	Gene	Pantothenate (µg/ml)
FV5069/pFV31	-	2
FV5069/pFV31/pND-D1	panD <sub>E.c.</sub>	47
FV5069/pFV31/pND-D2	panD <sub>C.g.</sub>	69

## SEQUENCE LISTING

### (1) GENERAL INFORMATION:

#### (i) APPLICANT:

- 5 (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft  
(B) STREET: Weissfrauenstr. 9  
(C) CITY: Frankfurt am Main  
(D) FEDERAL STATE: Hessen  
(E) COUNTRY: Germany  
10 (F) POSTAL CODE: D-60311

- (ii) TITLE OF THE INVENTION: Process for the production of D-  
pantothenic acid by fermentation using strains of the  
enterobacteriaceae family

15

- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

#### (iv) COMPUTER-READABLE FORM:

- 20 (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, version #1.30 (EPO)

### (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.: 1:

25

#### (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 540 base pairs  
(B) TYPE: Nucleotide  
(C) STRANDEDNESS: Double  
30 (D) TOPOLOGY: Linear

- (ii) MOLECULE TYPE: Genomic DNA

- (iii) HYPOTHETICAL: NO

35

- (iv) ANTISENSE: NO

#### (vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Corynebacterium glutamicum

(B) STRAIN: ATCC13032

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 77..484

(D) OTHER INFORMATION: /codon\_start= 77

/EC\_number= 4.1.1.11

/product= "L-Aspartat 1-Decarboxylase"

/gene= "panD"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.: 1:

AAATATTCCTT TCCTTGTCAT CTCACGCTAT GATTTCTAAA ACTTGCAGGA CAACCCCAT	60
AAGGACACCA CAGGAC ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC	109
Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His	10
CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC	157
Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr	25
ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GCC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA	205
Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys	40
GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC	253
Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val	55
ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT	301
Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala	75
GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT	349
Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu	90
CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC	397
Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His	105
GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA	445
Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu	120
GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTTA	494
Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile	135
GCTCCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC	540

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 136 amino acids  
(B) TYPE: Amino acid  
(D) TOPOLOGY: Linear

(ii) MOLECULE TYPE: Protein

10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.: 2:

Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr  
1 5 10 15  
Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu  
20 25 30  
Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp  
35 40 45  
Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala  
50 55 60  
Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala Ala His Leu Ile Asn  
65 70 75 80  
Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala  
85 90 95  
Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn  
100 105 110  
Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser  
115 120 125  
Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile  
130 135

## Figures

The following figures are appended:

Figure 1: Map of Contig 13 with orf1-orf5

Figure 2: Map of the plasmid pZ8-1 and cloning strategy for the plasmids pND-D1 and pND-D2

5

The abbreviations used in the figures have the following meaning:

T1T2: Transcription terminator of the *rrnB* gene

Ptac: tac promoter

panD: Coding region of the *panD* gene

10 rep-C.g.: DNA region for replication in *C. glutamicum*

oriV-E.c.: Origin for vegetative transfer in *E. coli*

kan: Kanamycin resistance gene

EcoRI: Cleavage site of the restriction enzyme EcoRI

E: Cleavage site of the restriction enzyme EcoRI

15 BamHI: Cleavage site of the restriction enzyme BamHI

B: Cleavage site of the restriction enzyme BamHI

BglII: Cleavage site of the restriction enzyme BglII

Clal: Cleavage site of the restriction enzyme Clal

H: Cleavage site of the restriction enzyme HindIII

20 P: Cleavage site of the restriction enzyme PstI

PstI: Cleavage site of the restriction enzyme PstI

Sall: Cleavage site of the restriction enzyme Sall

Scal: Cleavage site of the restriction enzyme Scal

SphI: Cleavage site of the restriction enzyme SphI

25 X: Cleavage site of the restriction enzyme XbaI

XhoI: Cleavage site of the restriction enzyme XhoI

## Patent claims

1. A process for the production of D-pantothenic acid by fermentation of microorganisms which produce D-pantothenic acid and are of the enterobacteriaceae family, which comprises employing strains which  
5 a) contain the plasmid pFV31 and/or pFV202, and, in these microorganisms,  
b) amplifying, in particular overexpressing, a panD gene and, where appropriate, other nucleotide sequences coding for aspartate 1-  
10 decarboxylase,  
c) concentrating the pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms and  
d) isolating the pantothenic acid formed.
2. A process as claimed in claim 1, wherein there is use of  
15 microorganisms with a replicable DNA whose nucleotide sequence codes for panD originating from a Corynebacterium.
3. A process as claimed in claim 2, wherein the replicable DNA is characterized by  
20 (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No. 1 which codes for panD, or  
(ii) a sequence which corresponds to the sequence (i) within the range of degeneracy of the genetic code, or  
(iii) a sequence which hybridizes with a sequence complementary to sequence (i) or (ii), and, where appropriate,  
25 (iiii) harbors functionally neutral sense mutations in (i).
4. A process as claimed in claim 1, wherein there is use of microorganisms in which, to achieve the amplification (overexpression) of the genes or nucleotide sequences, the copy number is increased with the aid of plasmid vectors harboring these genes or nucleotide sequences.
- 30 5. A process as claimed in claim 1, wherein there is use of microorganisms in which, to achieve the overexpression, the promoter and regulatory region located upstream of the structural gene is mutated.
6. A process as claimed in claim 1, wherein there is use of microorganisms in which, to achieve the overexpression, expression cassettes are  
35 incorporated upstream of the structural gene.
7. A process as claimed in claim 1, wherein to achieve the amplification the life span of the mRNA which is read as template by the abovementioned sequences is extended and/or the breakdown of the corresponding enzyme protein(s) is prevented.



8. A process as claimed in claims 1 to 7, wherein there is use of microorganisms which have additional metabolite or antimetabolite resistance mutations, singly or together.
9. A process as claimed in claims 1 to 8, wherein to achieve the overexpression the microorganisms are fermented in appropriately changed culture media or the management of the fermentation is altered.
10. A process as claimed in claims 1 to 9, wherein there is use of microorganisms in which the metabolic pathways which reduce pantothenate (pantothenic acid) formation are at least partially eliminated.
- 10 11. A process as claimed in claims 1 to 10, wherein there is use of microorganisms in which, in addition to the panD gene, the other genes of the metabolic pathway of pantothenic acid formation, in particular with a *Corynebacterium* origin, are overexpressed singly or together.
12. A process as claimed in claim 11, wherein there is use of microorganisms in which one or more of the genes which code for the enzymes ketopantoate hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12) and pantothenate synthetase (EC 6.3.2.1) are overexpressed in addition to the panD gene, in particular with a *Corynebacterium* origin.
- 15 13. A process as claimed in claims 11 and 12, wherein there is use of microorganisms transformed with various compatible plasmid vectors containing said genes singly.
- 20 14. A process as claimed in claims 11 and 12, wherein there is use of a microorganism of the species *E. coli* which is transformed with a plasmid vector, and the plasmid vector harbors one or more of said genes, including the panD gene, in which said genes are arranged consecutively and are under the control of a joint promoter or are arranged separately from one another under the control of different promoters.
- 25 15. A process as claimed in one or more of the preceding claims, wherein there is use of microorganisms which contain the plasmid vector pND-D2 which is characterized by the restriction map depicted in Fig. 2, deposited as *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-D2 under the number DSM 12438.
- 30 16. A process for the production of pantothenic acid as claimed in one or more of the preceding claims, which comprises carrying out the following steps:
- 35 a) fermentation of microorganisms of the species *E. coli* in which at least the panD gene is amplified (overexpressed), where appropriate in combination with the panB and/or panC gene,
- b) concentration of the pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms, and
- c) isolation of the pantothenic acid.

17. A process as claimed in claim 16, wherein the overexpressed genes derive from microorganisms of the genus *Corynebacterium*.

18. A process as claimed in claims 16 or 17, wherein in stage a) a precursor of pantothenic acid selected from the group of aspartate,  $\beta$ -alanine, ketopantoate, ketoisovalerate or pantoate is added.

19. A microorganism of the genus *E. coli* which contains the plasmid pFV 31 and/or pFV 202 and is transformed by introduction of a replicable DNA, characterized by

- (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No. 1 which codes for panD, or
- (ii) a sequence which corresponds to the sequence (i) within the range of degeneracy of the genetic code, or
- (iii) a sequence which hybridizes with a sequence complementary to sequence (i) or (ii), and, where appropriate,
- (iiii) harbors functionally neutral sense mutations in (i).

Figure 1

Figure 2

## Method for the fermentative production of D-pantothenic acid using Enterobacteriaceae strains

Patent Number: EP1006193  
Publication date: 2000-06-07  
Inventor(s): KALINOWSKI JOERN DR (DE); PFEFFERLE WALTER DR (DE); DUSCH NICOLE DR (DE); PUEHLER ALFRED PROF DR (DE); RIEPING MECHTHILD DR (DE); THIERBACH GEORG DR (DE)  
Applicant(s):: DEGUSSA (DE)  
Requested Patent: ☐ EP1006193  
Application Number: EP19990122651 19991113  
Priority Number(s): DE19981055314 19981201  
IPC Classification: C12N15/60 ; C12N15/54 ; C12N15/77 ; C12P13/02 ; C12N1/21 ; C12R1/15 ; C12R1/19  
EC Classification: C12N9/88, C12N15/52, C12P13/02  
Equivalents: ☐ DE19855314, JP2000166578

### Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - l2

